

ASSESSMENT OF VARIOUS STRATEGIES FOR THE PRESERVATION OF CLONAL GENETIC RESOURCES IN OIL-PALM (*Elaeis guineensis* JACQ.)

K. E. KONAN¹, A. RIVAL², Y. J. KOUADIO³, Y. DUVAL⁴, A. FLORI⁵, B. ADON¹, C. PENE¹
and T. D.-GASSELIN⁵

¹CNRA, Station de La Mé 13 BP 989 Abidjan13, Côte d'Ivoire (eugenekonank@hotmail.com)

²CIRAD Cultures Pérennes. Present Address: CSIRO Plant Industry, GPO Box 1600, ACT 2601 Canberra, Australia

³UFR des Sciences de la Nature, Université Abobo-Adjamé, 02 BP 801, Abidjan 02, Côte d'Ivoire

⁴IRD, UMR1098, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 01, France

⁵CIRAD Cultures Pérennes, UPR28, TA 80/03, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex5 - France

ABSTRACT

Three different approaches for the preservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clonal genetic resources and their impacts on the induction of the « mantled » somaclonal variation were assessed. *In vitro* long term preservation of somatic embryos stock-cultures was studied : after a 5 year cultivation period, 75 % of clonal lines were still normal. Between 8 and 13 years of embryo cultures, half of the considered clonal lines were found to be « mantled ». Finally, 40 % were found to be normal over 15 years of *in vitro* conservation. Clonal conformity of ramets resulting from the re-cloning of somaplants depended, on one hand, on the floral status of the mother plant at the time of sampling and, on the other hand, on its origin. Re-cloning of abnormal regenerants led, in all cases, to 100 % abnormal offspring. The age of the ramet used as mother palm at the time of sampling was found to be critical for true-to-type regeneration. There is a high risk of obtaining variant regenerant palms if the clonal mother palm is sampled at nursery stage. Field observations carried out on palms originating from somatic embryos cryopreserved at -196 °C showed floral conformity rates comparable to those obtained from standard not-cryopreserved clonal palms, for 6 out of the 8 clonal lines studied. From the 2 remaining clonal lines, a few regenerant palms originating from standard batch were found to be « mantled », whereas those resulting from cryopreserved embryos were all normal. The assumption of changes in levels of genomic DNA methylation during preservation was discussed, together with the capacity of our cryopreservation protocol to select embryogenic cells which were only suited to true-to-type regeneration.

Key words : *In situ* preservation, « mantled » floral abnormality, somaclonal variation, somatic embryogenesis, oil palm, Côte d'Ivoire

RESUME

EVALUATION DE DIFFERENTES STRATEGIES DE CONSERVATION DES RESSOURCES GENETIQUES CLONALES
DE PALMIER A HUILE (*Elaeis guineensis* JACQ.)

Trois approches de conservation des ressources génétiques clonales de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) ont été testées et leurs incidences sur l'induction de la variation somaclonale « mantled » ont été évaluées. La conservation *in vitro* à long terme des souches d'embryons somatiques a montré qu'après 5 ans de culture, 75 % des clones étaient encore normaux. Entre 8 et 13 ans de culture, la moitié des clones a présenté des plants à floraison anormale « mantled ». Finalement, 40 % des clones étaient toujours normaux même après 15 ans de conservation *in vitro*. La conformité florale des plants issus de reclonage de vitroplants dépend, d'une part, du statut floral du palmier donneur au moment de son utilisation et, d'autre part, de l'origine de la lignée clonale à laquelle il appartient. Le reclonage de régénérants anormaux a conduit, dans tous les cas, à 100 % de descendance anormales. L'âge du vitro plant donneur au moment de son prélèvement semble être essentiel pour l'obtention d'une régénération conforme. Un

grand risque d'obtention de régénérants variants existe si le plant utilisé est prélevé au stade pépinière. Les observations réalisées sur les palmiers issus d'embryons cryoconservés à -196 °C ont montré des taux de conformité florale comparables à ceux issus d'embryons témoins non congelés, pour 6 des 8 clones étudiés. Pour les 2 autres clones, quelques plants issus d'embryons témoins ont présenté la variation florale « mantled », alors que ceux issus d'embryons cryo-conservés ont tous été normaux. L'hypothèse d'une modification du niveau de méthylation de l'ADN génomique au cours de la durée de la conservation a été discutée et la capacité de notre protocole de cryoconservation à sélectionner les cellules embryogènes aptes à une régénération conforme de plants.

Mots clés : Conservation in situ, anomalie florale « mantled », variation soma clonale, embryogenèse somatique, palmier à huile, Côte d'Ivoire.

INTRODUCTION

Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) is a perennial oil crop cultivated in the tropical humid regions. It has been for more than 20 years, the second world source of vegetable oil after soybean (Fry, 2002). Oil palm has the highest oil yield per hectare among oleaginous crops (Corley, 2003), with some of the best recent progenies being able to reach more than 10 t/yr/ha under suitable agro-ecological conditions. Nevertheless, oil palm farming is still at its early stages in terms of number of generations of improved plant material made available to farmers (Durand-Gasselin *et al.*, 2002). There is indeed a huge genetic potential for oil palm, a sexually propagated allogamous species, still to be exploited. In this context, the *in vitro* cloning of elite palms through somatic embryogenesis has been proposed (Noiret, 1981) in order to take advantage of the high degree of variability which still resides among improved progenies.

Using this technique, the expected increase in oil production has been estimated to reach 25 to 30 % (Soh, 1986, Meunier *et al.*, 1988). These forecasts were confirmed by results from large scale field trials, carried out worldwide (Durand-Gasselin *et al.*, 1993 ; Corley *et al.*, 1995 ; Cochard *et al.*, 1999). A number of clones were found to perform well and they constitute now the best planting material to be broadcasted to planters. Unfortunately, it was also demonstrated that the availability of somatic embryos was one of the major bottlenecks for the use of tissue culture for the large scale production of elite material (Rival *et al.*, 1998).

Indeed, the very long period (at least 10 years) which is needed for field assessment of oil palm clonal offspring requires the *in vitro* conservation and propagation of somatic embryos, with a high risk of somaclonal variation and genetic/epigenetic changes in cultures. The most important somaclonal variation described in oil

palm affects organs in flowers of both sexes, resulting in a feminization of male parts. It is specific to palms originating from tissue culture and can be detected only after 2-3 years of field plantation. This abnormality has been identified for the first time in Malaysia by Corley *et al.* (1986) who named it « mantled », then it has been described by various authors in clonal plantings worldwide (Duval *et al.*, 1988 ; Paranjothy *et al.*, 1989 ; Wooi, 1990 ; Durand-Gasselin *et al.*, 1993).

In most severe cases, the « mantled » abnormality may induce total sterility of palms, thus hampering the development of large scale production of clonal material. Nevertheless, it is worth noting that most of the clonal lines produced have never been abnormal and that the average impact is only 5 % of regenerants in planting material (Durand-Gasselin *et al.*, 1993 ; Konan *et al.*, 1995). Furthermore, a constant reversion of « mantled » material towards a normal phenotype has been recorded, even in palms, which were very severely affected by somaclonal variation at the young age (Durand-Gasselin *et al.*, 1993 ; Konan *et al.*, 1995 ; Duval *et al.*, 1997). Commercial production of oil palm clones through somatic embryogenesis is now integrating the risk of « mantled » variation (Corley, 2003). In parallel, molecular studies are under way, aimed at tackling this phenomenon and understanding its molecular basis (Tregear *et al.*, 2002 ; Jaligot *et al.*, 2000 ; Rival *et al.*, 2003 ; Rival et Parveez, 2004).

It is thus of paramount importance to explore various methods of plant genetic resources preservation, in order to maintain the genetic stability of improved oil palm clonal germplasm.

In this work, three different strategies were investigated :

The *in vitro* preservation of somatic embryos as poly-embryonic cultures : following this strategy, somatic embryos are made directly available,

at any time of the preservation process, for large scale production of microplants. The genetic stability of regenerated plants must be assessed by the continuous planting of aliquot batches at different *in vitro* cultivation times (Durand-Gasselin *et al.*, 1993) ;

The cryopreservation of embryogenic masses in liquid nitrogen (-196 °C) : this alternative technology has been successfully developed for oil palm (Engelmann *et al.*, 1985 ; Dumet *et al.*, 1993a,b ; Chabrilange *et al.*, 2000) in the aim of improving the *in vitro* management of germplasm, collection and preserving genetic resources on the long term, while limiting the risks of losses by contamination and genetic instability due to the cultivation of somatic embryos on a prolonged period ;

The *in situ* preservation as living collections in the field : somaplants can be sampled again for a second (and even third) cloning operation through somatic embryogenesis (recloning of somaplants or « ramets »). This strategy notably differs from the two others : despite its considerable cost, it enables the long term preservation in the field of valuable germplasm which can be exploited at any time for the production of new generations of somaplants.

These three different approaches (namely : preservation, cryopreservation and the re-cloning of clonal material) were studied for the preservation of oil palm clonal genetic resources and their respective impact on the induction of the « mantled » somaclonal variation has been assessed.

MATERIAL AND METHODS

PLANT MATERIAL

Plant material used in the present study was adult *tenera* oil palms (*Elaeis guineensis* Jacq.), aged 10 - 20 years at the time of field sampling for *in vitro* culture. These were mother palms (ortets) previously selected for their outstanding field performance from the best crosses among progeny trials planted at La Mé Research Station, Centre National de Recherche Agronomique (CNRA) in Côte d'Ivoire. The experiment aimed at assessing the stability of embryo cultures involving 20 different clonal lines. Six clonal lines were tested in a cryopreservation experiment, and the recloning procedure was

implemented using 28 regenerant palms originating from 17 different clonal lines.

IN VITRO CULTURE AND GENERATION OF EMBRYOGENIC LINES

The production of oil palm somaplants followed protocols for somatic embryogenesis, which have been already described (Pannetier *et al.*, 1981 ; Duval *et al.*, 1995). This procedure enabled the production of Stabilised Polyembryonic Cultures (SPCs), which could be cultivated indefinitely on a hormone-free modified MS medium (Wong *et al.*, 1996 ; Konan *et al.*, 2005).

PRESERVATION OF CLONAL GENETIC RESOURCES

In vitro preservation

In this experiment, one single line of SPC was used per clonal line. Once a year, SPC cultures were transferred onto shoot development medium in order to produce a sizeable batch of plants. These somaplants were then acclimatized and field-planted in order to assess their performances, especially the impact of the « mantled » floral abnormality. The number of somaplants may vary from one clonal line to the other or from one year to the other, depending on laboratory constraints and nursery/field availability.

Cryopreservation

The protocols for embryo cryopreservation used in the present study were specifically developed for oil-palm by Engelmann (1985) and Dumet *et al.* (1993a,b). Cryopreserved material was made up of somatic embryos sampled from SPC cultures. The Dumet *et al.* (1993a,b) procedure cryopreservation used, combined three main steps :

Desiccation : Masses of somatic embryos (250 to 300 mg_{FW}) were sampled from SPCs and cultivated for 7 days on a multiplication medium (Pannetier *et al.*, 1981) supplemented with 0.75 M sucrose, then kept for 16 h on silica gel (5 embryo masses per 40 g of silica gel) ;

Freezing : Desiccated embryo masses were transferred to sterile cryotubes then directly soaked in liquid nitrogen for at least one hour. They were then preserved indefinitely at -196 °C in liquid nitrogen ;

Thawing and embryos multiplication : Cryotubes containing cryopreserved embryo masses were taken out of liquid nitrogen and rapidly soaked in a water bath at 40 °C for 2 min. Embryos were then *in vitro* cultivated for one week on a medium supplemented with 0.3 M sucrose and 0.2 mg.l⁻¹ 2,4-D, then for 2 weeks on the same medium, with a lower concentration of sucrose (0.1 M). Embryos were then transferred onto standard multiplication medium without growth regulators.

The incidence of each cryopreservation step on the conformity of regenerated plant material was assessed for each clonal line through field monitoring, performed on 3 batches of somaplants originating from 3 different embryo cultures. Each of these cultures were derived from the same original culture, but they differed from their treatments :

- Standard treatment (S) : Somatic embryos were neither desiccated nor frozen ; they were directly transferred for the production of somaplants ;
- « Desiccation Only » treatment (DO) : Somatic embryos underwent the whole desiccation treatment, but were not placed in liquid nitrogen ;
- « Desiccation-Liquid Nitrogen » treatment (DLN) : In this case, the whole cryopreservation procedure was applied to somatic embryos (desiccation, freezing, thawing, re-growth). Embryos were then transferred onto shoot growth medium.

After desiccation, water content of embryos was monitored in order to secure the following freezing procedure. As a consequence, some of the batches from the (DO) treatment were missing for several clonal lines, as somatic embryos were preferably used for water content measurements.

***In situ* field collection**

Preservation of clonal oil palm genetic resources as *in situ* field collections is the most common strategy. In this case, the preserved germplasm comprises nursery or field planted clonal plants.

Recloning experiments were performed on palms originating from either nursery stage (not yet

flowering) or field plantings (palms aged 3-8 years with monitored flowering). As a result, 28 clonal lines were obtained from the recloning of 19 somaplants. The floral phenotype of ramets used as mother palms could be of 3 types : « mantled » somaplants, normal somaplants, or nursery somaplants of undetermined floral phenotype. We have considered the floral phenotype of the recloned ramet of the somaplants from previous plantings of the same clonal line and of the somaplants population from where the ramet originated. From this epigenetic background, 4 different classes of recloned ramets could be differentiated (Table 1).

Field monitoring of floral trueness-to-type

The « mantled » character could be observed with the naked eye, as soon as the first flowering occurred, more often after 2 to 3 years in the field. The feminization of male organs (staminodes into pseudocarpels) can be observed on flowers of both sexes. It is worth noting that, especially at early flowerings of young palms, the identification of « mantled » male flowers were difficult, because of their resemblance with androgynous male flowers. In the present study, a careful dissection of flowers has been performed before classification.

Observed flowers were grouped into three different classes (Table 2), depending on the severity of the « mantled » character : normal (N), slightly mantled (SM) or severely mantled (M). Each class usually corresponds to a precise classification of floral parameters (Konan *et al.*, 1995). For simplicity, all the « mantled » palms were grouped in a single class, « mantled » (M).

Regenerant palms originating from the three tested preservation strategies were observed in the field at 3-4 years after planting. Estimation of the frequency of abnormal and normal palms were performed on female flowers only. A given clonal line was recorded as « mantled » if at least one somaplant from this line has generated « mantled » inflorescences (whether slight or severe).

Table 1 : Characteristics of the various class of ramets selected for recloning in oil palm.

Caractéristiques des différentes classes de vitroplants utilisés pour le reclonage chez le palmier à huile.

Class	Floral status of the ramet	Floral status of the population of ramets	Floral status of the clonal line of origin	Number of recloned ramets
I	Abnormal (AN)	Abnormal (AN)	Abnormal (AN)	4
II	Normal (N)	Normal (N)	Abnormal (AN)	6
III	Normal (N)	Normal (N)	Normal (N)	13
IV	Unknown (U)	Unknown (U)	Normal (N)	5

Table 2 : Description and scoring of the severity of the « mantled » floral abnormality in oil palm adult somaplants.

Description et notation de l'intensité de l'anomalie florale « mantled » observée sur les vitroplants adultes.

Male Flower	Normal	Normal	Normal	Slightly mantled	Mantled
Female Flower	Normal	Slightly mantled	Mantled	Mantled	Mantled
Mark of somaplant	1 - 1	1 - 2	1 - 3	2 - 3	3 - 3
Floral status of somaplant	Normal (N)	Slightly mantled (SM)	Severely Mantled (M)	Severely Mantled (M)	Severely Mantled (M)

RESULTS

IN VITRO PRESERVATION OF SOMATIC EMBRYOS

Regenerated palms originating from embryo lines *in vitro* cultivated for 2 to 6 years were found to be almost 100 % normal (Figure 1).

Embryo cultures aged 6 to 8 years produced 80 % normal somaplants only, and this rate decreased during the following years to reach 75 % after a 14-year cultivation period (Table 3). After 5 years of tissue culture, 16 clonal lines out of 20 (80 %) did not produce any abnormal palm. Four clonal lines (20 %) gave palms with abnormal flowers, the abnormality being observed at different dates depending on the line. It is worth noting that clonal line LMC 063 produced abnormal palms as early as the second year of *in vitro* cultivation. Regenerants palms showing a « mantled » phenotype were observed on clonal lines LMC 152 and LMC 051 in year 3 and 5 respectively, whereas the first abnormal palm

generated from clonal line LMC 130 appeared after 5 years of embryo culture.

The 4 clonal lines, which were found abnormal during the first 5 years of *in vitro* preservation, showed increasing ratios of abnormal palms during the following years : in fact, somaplants produced with clonal line LMC 063 were all abnormal after a 9-year period of somatic embryo culture.

After 10-years of *in vitro* embryo preservation, somaplants were still found 100 % normal in 10 clonal lines (LMC 009, LMC 022, LMC 044, LMC 074, LMC 158, LMC 159, LMC 161, LMC 167, LMC 172 and LMC 174) from the 16 original lines which were 100 % normal after 5 years. In the 6 remaining clonal lines (normal after 5 years), some « mantled » palms were observed after 6-7 years in LMC 052, LMC 106, LMC 107 and LMC 144, and after 9 - 10 years in LMC 026 et LMC 165. Between 11 and 15 years of *in vitro* culture, none of the planted clones which were initially normal did change phenotype. After 17 years, 3 clonal lines (LMC 009, LMC 022 et LMC 044) were still 100 % normal.

No increase of the rate of abnormality was noted. This could be due to the duration of the *in vitro* cultivation period of somatic embryo lines. Ten clonal lines were found to be highly stable after 10 years in the laboratory. When the whole collection (20 lines) was considered, 80 - 85 % of clonal lines remained normal during the first 2 - 5 years of *in vitro* preservation. During this period, regenerated palms were almost all normal (98 - 100 %), with an average abnormality rate of 2 %. After year 5, a decrease in normal clonal lines was clearly observed, with 50 % of lines showing abnormal regenerants. Between year 10 and 13, almost 45 % of clonal lines were still found normal, with 80 % of somaplants showing normal flowering. After 17 years of *in vitro* preservation, only 25 % of the original collection of clonal lines were still able to produce normal regenerants.

CRYOPRESERVATION

Regenerant palms originating out of five of the six tested clonal lines (except LMC 051) were found to be 100 % normal, no matter the treatment applied (Table 4). Even clonal lines LMC 248 and LMC 249 with respectively 6 %

and 4 % « mantled » in previous plantings, generated 100 % normal palms in all treatments.

Cryopreservation treatments induced changes in the rate of abnormality. Indeed, in clonal line LMC 051, while only 71 % of palms originating from the « standard » treatment were found normal, their counterparts originating from « Desiccation Only » and « Desiccation-LN » treatments showed respectively 87 % and 95 % normal flowerings. However these discrepancies were not statistically significant ($\chi^2 = 0.59$). Similarly, the proportion of « mantled » palms originating from standard and DO treatment, respectively 29 % and 13 %, were not significantly different ($\chi^2 = 1.49$). Interestingly, the proportion of « mantled » palms generated through the standard protocol is significantly higher (29 %) than the one observed in palms which were cryopreserved through the (DLN) treatment (5 % ; $\chi^2 = 5.38$).

RECLONING FROM SOMAPLANTS

We found that the floral status of clonal palms produced by the second or third cloning of somaplants depended on the floral phenotype of : i) the recloned ramet itself, ii) the somaplants

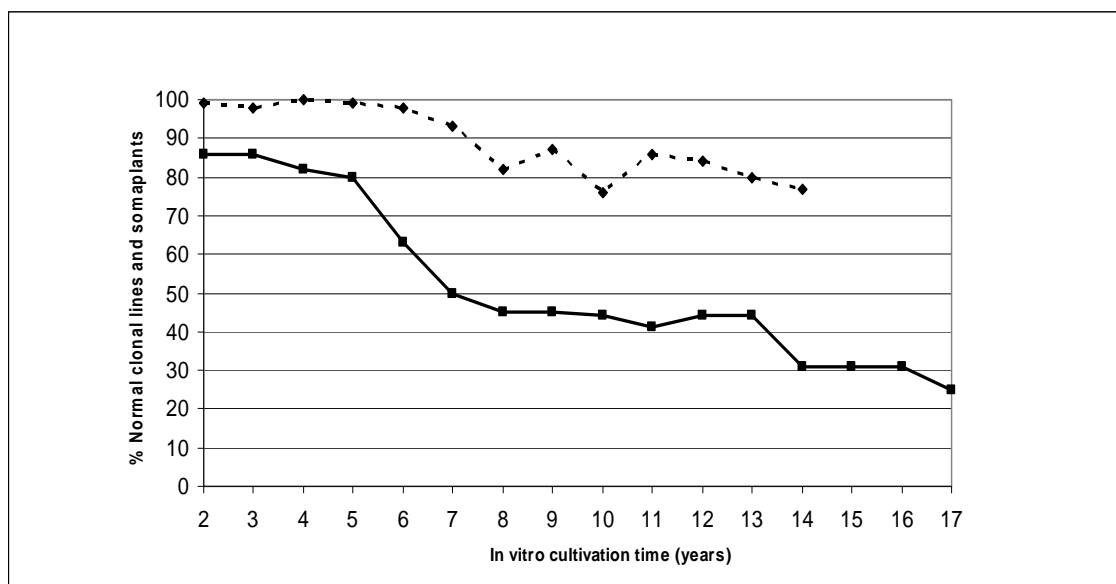


Figure 1 : Changes in floral phenotypes on oil palm clone line and somaplants following the age of *in vitro* culture.

Evolution du phénotype floral observé sur les clones et vitroplants de palmier à huile en fonction de l'âge des cultures in vitro.

Accession	Accession 1										Accession 2										Accession 3										Accession 4										Accession 5										Accession 6										Accession 7										Accession 8										Accession 9										Accession 10										Accession 11										Accession 12										Accession 13										Accession 14										Accession 15										Accession 16										Accession 17										Accession 18										Accession 19										Accession 20										Accession 21										Accession 22										Accession 23										Accession 24										Accession 25										Accession 26										Accession 27										Accession 28										Accession 29										Accession 30										Accession 31										Accession 32										Accession 33										Accession 34										Accession 35										Accession 36										Accession 37										Accession 38										Accession 39										Accession 40										Accession 41										Accession 42										Accession 43										Accession 44										Accession 45										Accession 46										Accession 47										Accession 48										Accession 49										Accession 50										Accession 51										Accession 52										Accession 53										Accession 54										Accession 55										Accession 56										Accession 57										Accession 58										Accession 59										Accession 60										Accession 61										Accession 62										Accession 63										Accession 64										Accession 65										Accession 66										Accession 67										Accession 68										Accession 69										Accession 70										Accession 71										Accession 72										Accession 73										Accession 74										Accession 75										Accession 76										Accession 77										Accession 78										Accession 79										Accession 80										Accession 81										Accession 82										Accession 83										Accession 84										Accession 85										Accession 86										Accession 87										Accession 88										Accession 89										Accession 90										Accession 91										Accession 92										Accession 93										Accession 94										Accession 95										Accession 96										Accession 97										Accession 98										Accession 99										Accession 100										Accession 101										Accession 102										Accession 103										Accession 104										Accession 105										Accession 106										Accession 107										Accession 108										Accession 109										Accession 110										Accession 111										Accession 112										Accession 113										Accession 114										Accession 115										Accession 116										Accession 117										Accession 118										Accession 119										Accession 120										Accession 121										Accession 122										Accession 123										Accession 124										Accession 125										Accession 126										Accession 127										Accession 128										Accession 129										Accession 130										Accession 131										Accession 132										Accession 133										Accession 134										Accession 135										Accession 136										Accession 137										Accession 138										Accession 139										Accession 140										Accession 141										Accession 142										Accession 143										Accession 144										Accession 145										Accession 146										Accession 147										Accession 148										Accession 149										Accession 150										Accession 151										Accession 152										Accession 153										Accession 154										Accession 155										Accession 156										Accession 157										Accession 158										Accession 159										Accession 160										Accession 161										Accession 162										Accession 163										Accession 164										Accession 165										Accession 166										Accession 167										Accession 168										Accession 169										Accession 170										Accession 171										Accession 172										Accession 173										Accession 174										Accession 175										Accession 176										Accession 177										Accession 178										Accession 179										Accession 180										Accession 181										Accession 182										Accession 183										Accession 184										Accession 185										Accession 186										Accession 187										Accession 188										Accession 189										Accession 190										Accession 191										Accession 192										Accession 193										Accession 194										Accession 195										Accession 196										Accession 197										Accession 198										Accession 199										Accession 200										Accession 201										Accession 202										Accession 203										Accession 204										Accession 205										Accession 206										Accession 207										Accession 208										Accession 209										Accession 210										Accession 211										Accession 212										Accession 213										Accession 214										Accession 215										Accession 216										Accession 217										Accession 218										Accession 219										Accession 220										Accession 221										Accession 222										Accession 223										Accession 224										Accession 225										Accession 226										Accession 227										Accession 228										Accession 229										Accession 230										Accession 231										Accession 232										Accession 233										Accession 234										Accession 235										Accession 236										Accession 237										Accession 238										Accession 239										Accession 240										Accession 241										Accession 242										Accession 243										Accession 244										Accession 245										Accession 246										Accession 247										Accession 248										Accession 249										Accession 250										Accession 251										Accession 252										Accession 253										Accession 254										Accession 255										Accession 256										Accession 257										Accession 258										Accession 259										Accession 260										Accession 261										Accession 262										Accession 263										Accession 264										Accession 265										Accession 266										Accession 267										Accession 268										Accession 269										Accession 270										Accession 271										Accession 272										Accession 273										Accession 274										Accession 275										Accession 276										Accession 277										Accession 278										Accession 279										Accession 280										Accession 281										Accession 282										Accession 283										Accession 284										Accession 285										Accession 286										Accession 287										Accession 288										Accession 289										Accession 290										Accession 291										Accession 292										Accession 293										Accession 294										Accession 295										Accession 296										Accession 297										Accession 298										Accession 299										Accession 300										Accession 301										Accession 302										Accession 303										Accession 304										Accession 305										Accession 306										Accession 307										Accession 308										Accession 309										Accession 310										Accession 311										Accession 312										Accession 313										Accession 314										Accession 315										Accession 316										Accession 317										Accession 318										Accession 319										Accession 320										Accession 321										Accession 322										Accession 323										Accession 324										Accession 325										Accession 326										Accession 327										Accession 328										Accession 329										Accession 330										Accession 331										Accession 332										Accession 333										Accession 334										Accession 335										Accession 336										Accession 337										Accession 338										Accession 339										Accession 340										Accession 341										Accession 342										Accession 343										Accession 344										Accession 345										Accession 346										Accession 347										Accession 348										Accession 349										Accession 350										Accession 351										Accession 352										Accession 353										Accession 354										Accession 355										Accession 356										Accession 357										Accession 358										Accession 359										Accession 360										Accession 361										Accession 362										Accession 363										Accession 364										Accession 365										Accession 366										Accession 367										Accession 368										Accession 369										Accession 370										Accession 371										Accession 372										Accession 373										Accession 374										Accession 375										Accession 376										Accession 377										Accession 378										Accession 379										Accession 380										Accession 381										Accession 382										Accession 383										Accession 384										Accession 385										Accession 386										Accession 387										Accession 388										Accession 389										Accession 390										Accession 391										Accession 392										Accession 393										Accession 394										Accession 395										Accession 396										Accession 397										Accession 398										Accession 399										Accession 400										Accession 401										Accession 402										Accession 403										Accession 404										Accession 405										Accession 406										Accession 407										Accession 408										Accession 409										Accession 410										Accession 411										Accession 412										Accession 413										Accession 414										Accession 415										Accession 416										Accession 417										Accession 418										Accession 419										Accession 420										Accession 421										Accession 422										Accession 423										Accession 424										Accession 425										Accession 426										Accession 427										Accession 428										Accession 429										Accession 430										Accession 431										Accession 432										Accession 433										Accession 434										Accession 435										Accession 436										Accession 437										Accession 438										Accession 439										Accession 440										Accession 441										Accession 442										Accession 443										Accession 444										Accession 445										Accession 446										Accession 447										Accession 448										Accession 449										Accession 450										Accession 451										Accession 452										Accession 453										Accession 454										Accession 455										Accession 456										Accession 457										Accession 458										Accession 459										Accession 460										Accession 461										Accession 462										Accession 463										Accession 464										Accession 465										Accession 466										Accession 467										Accession 468										Accession 469										Accession 470										Accession 471										Accession 472										Accession 473										Accession 474										Accession 475										Accession 476										Accession 477										Accession 478										Accession 479										Accession 480										Accession 481										Accession 482										Accession 483										Accession 484										Accession 485										Accession 486										Accession 487										Accession 488										Accession 489										Accession 490										Accession 491										Accession 492										Accession 493										Accession 494										Accession 495										Accession 496										Accession 497										Accession 498										Accession 499										Accession 500										Accession 501										Accession 502										Accession 503										Accession 504										Accession 505										Accession 506										Accession 507										Accession 508										Accession 509										Accession 510										Accession 511										Accession 512										Accession 513										Accession 514										Accession 515										Accession 516										Accession 517										Accession 518										Accession 519										Accession 520										Accession 521										Accession 522										Accession 523										Accession 524										Accession 525										Accession 526										Accession 527										Accession 528										Accession 529										Accession 530										Accession 531										Accession 532										Accession 533										Accession 534										Accession 535										Accession 536										Accession 537										Accession 538										Accession 539										Accession 540										Accession 541										Accession 542										Accession 543										Accession 544										Accession 545										Accession 546										Accession 547										Accession 548										Accession 549										Accession 550										Accession 551										Accession 552										Accession 553										Accession 554										Accession 555										Accession 556										Accession 557										Accession 558										Accession 559										Accession 560										Accession 561										Accession 562										Accession 563										Accession 564										Accession 565										Accession 566										Accession 567										Accession 568										Accession 569										Accession 570										Accession 571										Accession 572										Accession 573										Accession 574										Accession 575										Accession 576										Accession 577										Accession 578										Accession 579										Accession 580										Accession 581										Accession 582										Accession 583										Accession 584										Accession 585										Accession 586										Accession 587										Accession 588										Accession 589										Accession 590										Accession 591										Accession 592										Accession 593										Accession 594										Accession 595										Accession 596										Accession 597										Accession 598										Accession 599										Accession 600										Accession 601										Accession 602										Accession 603										Accession 604										Accession 605										Accession 606										Accession 607										Accession 608										Accession 609										Accession 610										Accession 611										Accession 612										Accession 613										Accession 614										Accession 615										Accession 616										Accession 617										Accession 618										Accession 619										Accession 620										Accession 621										Accession 622										Accession 623										Accession 624										Accession 625										Accession 626										Accession 627										Accession 628										Accession 629										Accession 630										Accession 631										Accession 632										Accession 633										Accession 634										Accession 635										Accession 636										Accession 637										Accession 638										Accession 639										Accession 640										Accession 641										Accession 642										Accession 643										Accession 644										Accession 645										Accession 646										Accession 647										Accession 648										Accession 649										Accession 650										Accession 651										Accession 652										Accession 653										Accession 654										Accession 655										Accession 656										Accession 657										Accession 658										Accession 659										Accession 660										Accession 661										Accession 662										Accession 663										Accession 664										Accession 665										Accession 666										Accession 667										Accession 668										Accession 669										Accession 670										Accession 671										Accession 672										Accession 673										Accession 674										Accession 675										Accession 676										Accession 677										Accession 678										Accession 679										Accession 680										Accession 681										Accession 682										Accession 683										Accession 684										Accession 685										Accession 686										Accession 687										Accession 688										Accession 689										Accession 690										Accession 691										Accession 692										Accession 693										Accession 694										Accession 695										Accession 696										Accession 697										Accession 698										Accession 699										Accession 700										Accession 701										Accession 702										Accession 703										Accession 704										Accession 705										Accession 706										Accession 707										Accession 708										Accession 709										Accession 710										Accession 711										Accession 712										Accession 713										Accession 714										Accession 715										Accession 716										Accession 717										Accession 718										Accession 719										Accession 720										Accession 721										Accession 722										Accession 723										Accession 724										Accession 725										Accession 726										Accession 727										Accession 728										Accession 729										Accession 730										Accession 731										Accession 732										Accession 733										Accession 734										Accession 735										Accession 736										Accession 737										Accession 738										Accession 739										Accession 740										Accession 741										Accession 742										Accession 743										Accession 744										Accession 745										Accession 746										Accession 747										Accession 748										Accession 749										Accession 750										Accession 751										Accession 752										Accession 753										Accession 754										Accession 755										Accession 756										Accession 757										Accession 758										Accession 759										Accession 760										Accession 761										Accession 762										Accession 763										Accession 764										Accession 765										Accession 766										Accession 767										Accession 768										Accession 769										Accession 770										Accession 771										Accession 772										Accession 773										Accession 774										Accession 775										Accession 776										Accession 777										Accession 778										Accession 779										Accession 780										Accession 781										Accession 782										Accession 783										Accession 784										Accession 785										Accession 786										Accession 787										Accession 788										Accession 789										Accession 790										Accession 791										Accession 792										Accession 793										Accession 794										Accession 795										Accession 796										Accession 797										Accession 798										Accession 799										Accession 800										Accession 801										Accession 802										Accession 803										Accession 804										Accession 805										Accession 806										Accession 807										Accession 808										Accession 809										Accession 810										Accession 811										Accession 812										Accession 813										Accession 814										Accession 815										Accession 816										Accession 817										Accession 818										Accession 819										Accession 820										Accession 821										Accession 822										Accession 823										Accession 824										Accession 825										Accession 826										Accession 827										Accession 828										Accession 829										Accession 830										Accession 831										Accession 832</									
-----------	-------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-----------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Evolution de la conformité florale en fonction de la durée de conservation in vitro des cultures d'embryons somatiques de palmier à huile.

[illegible]

Table 4 : Changes in floral conformity in relation with the oil palm embryo cryopreservation methods.*Evolution de la conformité florale du palmier à huile selon le type de traitement de cryoconservation.*

Clonal Line	Floral status before treatment	Preservation treatments	Flowered palms	Normal palms	Mantled palms	% Normal Palms	% Mantled palms
LMC 022	11 years in the field	Standard	25	25	0	100 (a)	0
	Flowered palms : 3 202	Desiccation Only*	-	-	-	-	-
	Normal palms : 100 %	Desiccation + LN	38	38	0	100 (a)	0
LMC 051	12 years in the field	Standard	31	22	9	71 (a)	29
	Flowered palms : 4 161	Desiccation Only	30	26	4	87 (a) (b)	13
	Normal palms : 86 %	Desiccation + LN	39	37	2	95 (b)	5
LMC 119	4 years in the field	Standard	25	25	0	100 (a)	0
	Flowered palms : 202	Desiccation Only	27	27	0	100 (a)	0
	Normal palms : 100 %	Desiccation + LN	32	32	0	100 (a)	0
LMC 242	4 years in the field	Standard	28	28	0	100 (a)	0
	Flowered palms : 206	Desiccation Only	48	48	0	100 (a)	0
	Normal palms : 100 %	Desiccation + LN	1	1	0	100 (a)	0
LMC 248	4 years in the field	Standard	31	31	0	100 (a)	0
	Flowered palms : 376	Desiccation Only*	-	-	-	-	-
	Normal palms : 94 %	Desiccation + LN	41	41	0	100 (a)	0
LMC 249	3 years in the field	Standard	14	14	0	100 (a)	0
	Flowered palms : 280	Desiccation Only*	-	-	-	-	-
	Normal palms : 96 %	Desiccation + LN	30	30	0	100 (a)	0
Total 6 clonal lines		Standard	154	145	9	94 (a)	6
		Desiccation Only	105	101	4	96 (a) (b)	4
		Desiccation + LN	191	179	2	99 (b)	1

Percentage values followed by the same letter (a), (b) are not significantly different

Les pourcentages suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents

* Not applicable for not enough embryos cultures

from previous plantings of the same clonal line and iii) of the population of somaplants from which the ramet originated.

We have recloned 4 abnormal ramets belonging to Class I (abnormal ramet, abnormal population, abnormal clonal line). Results presented in Table 5 show that, in this case, the generated clonal lines were all « mantled », with a very high percentage of abnormal palms (60 to 100 %).

When ramets from Class III (normal ramet, normal population, abnormal clonal line) were recloned, trueness-to-type could not be guaranteed. Indeed, from 6 recloned ramets, only 4 (66 %) gave 100 % normal offspring, while 2 (33 %) generated clonal populations has 5 % « mantled » palms.

The recloning of ramets from Class IV (normal ramet, normal population, normal clonal line) seems to be the safest strategy in terms of genetic stability. In fact, from 13 recloned ramets

(including 2 ramets already originating from recloneings), no « mantled » palms were detected among the offspring.

Our results clearly show that rates of somaclonal variants in regenerants palms from a 2nd and even a 3rd cloning operation rely on the floral status of the ramet used as the source of explants. The presence of variants in one of the components of the triplet (ramet/population/clonal line) was sufficient to jeopardize the reclone operation.

The age of the recloned ramet at the time of sampling was also of paramount importance. Indeed, the « blind » reclone of Class V ramets at the nursery stage (thus without any information on their future floral status) appeared to be a very risky strategy in terms of floral conformity. From 5 ramets recloned from clonal line LMC 010, 44 % (2 palms) generated abnormal somaplants, although at very different rates (2 % and 92 %).

Table 5 : Impact of recloning on the floral conformity of oil palm regenerants.*Impact du reclonage sur la conformité florale des régénérants de palmier à huile.*

Original clonal line of ramet	Clonal line resulting of Recloning	Class of recloned ramet	Floral Status			Floral status of somaplants generated by recloning			
			Utilised ramet	Population of origin	Clonal line of origin	New recloned flowering soma plants	Normal	Abnormal	% Abnormal
LMC 017	LAB 257	I	AN	AN	AN	5	2	3	60
LMC 073	LAB 282	I	AN	AN	AN	100	11	89	89
LMC 088	LAB 256	I	AN	AN	AN	69	0	69	100
BC 062	LAB 255	I	AN	AN	AN	24	0	24	100
Total nbr of palms						198	13	185	93
Total new clones						4	0	4	100
LMC 036	LAB 206	III	N	N	AN	144	129	15	10
LMC 051	LAB 306	III	N	N	AN	38	38	0	0
LMC 051	LAB 334	III	N	N	AN	2	2	0	0
LMC 063	LAB 317	III	N	N	AN	43	36	7	16
BC 068	LAB 380	III	N	N	AN	155	153	0	0
BC 068	LAB 386	III	N	N	AN	58	58	0	0
Total nbr of palms						440	416	22	5
Total new clones						6	4	2	33
LMC 009	LAB 196	IV	N	N	N	16	16	0	0
LMC 009	LAB 197	IV	N	N	N	138	138	0	0
LMC 021	LAB 316	IV	N	N	N	2	2	0	0
LMC 022	LAB 376	IV	N	N	N	48	48	0	0
LMC 022	LAB 396	IV	N	N	N	28	28	0	0
LMC 032	LAB 384	IV	N	N	N	1	1	0	0
LMC 058	LAB 283	IV	N	N	N	1	1	0	0
LMC 072	LAB 381	IV	N	N	N	48	48	0	0
LMC 072	LAB 382	IV	N	N	N	24	24	0	0
LMC 077	LAB 408	IV	N	N	N	35	35	0	0
LMC 119	LAB 409	IV	N	N	N	7	7	0	0
LMC 010 (LAB 200)	LAB 479 *	IV	N	N	N	26	26	0	0
LMC 010 (LAB 201)	LAB 480 *	IV	N	N	N	12	12	0	0
Total nbr of palms						386	386	0	0
Total new clones						13	13	0	0
LMC 010	LAB 200	V	U	U	N	100	100	0	0
LMC 010	LAB 201	V	U	U	N	8	8	0	0
LMC 010	LAB 202	V	U	U	N	100	96	2	2
LMC 010	LAB 203	V	U	U	N	129	129	0	0
LMC 010	LAB 204	V	U	U	N	48	2	44	92
Total nbr of palms						385	335	46	12
Total new clones						5	3	2	44

These new clones have undertaken 3 *in vitro* cloning (reclonings of LMC10 line).

Abbreviations : N - Normal female flowering, AN - Abnormal female flowering

DISCUSSION

IN VITRO PRESERVATION OF SOMATIC EMBRYOS

Results show that the cultivation of oil palm embryogenic lines on prolonged periods induced an increase in the proportion of « mantled » clonal lines and somaplants, thus confirming observations made by Corley *et al.* (1986). However this increase could not be considered as a general tendency for all clonal lines, as large discrepancies between lines were observed. Clonal lines could be classed in 3 different categories :

- clonal lines with high *in vitro* stability, which did not generate any somaclonal variant, even after 17 years of *in vitro* cultivation as embryo lines ;

- clonal lines showing early signs of instability : « mantled » abnormality was detected after a few years of *in vitro* preservation and then regularly increased with preservation time ;

- clonal lines showing late signs of instability : « mantled » abnormality was detected after a few years (> 5) of *in vitro* preservation.

Various hypothesis have been set forth concerning the biochemical and molecular origin of the « mantled » somaclonal variation in oil palm (Soh, 1986 ; Rao and Donough, 1990 ; Marmey *et al.*, 1991 ; Morcillo *et al.*, 2000 ;

Jaligot *et al.*, 2000 ; Tregear *et al.*, 2002 ; Rival *et al.*, 2003 ; Rival and Parveez, 2004).

Among these hypothesis, the implication of cytokinins, a family of plant growth regulators widely used in tissue culture, is worth confronting with our results. Besse *et al.* (1992, 1994), then Jones *et al.* (1995) have showed that the occurrence of the « mantled » abnormality could be related to changes in endogenous cytokinin metabolism. Indeed, FGC (Fast Growing Calluses) which generated 100 % mantled palms were found to have a lower cytokinin content than NCC (Nodular Compact Calluses) resulting in less than 5 % mantled palms. It is thus possible that successive transfers of somatic embryos deriving from calluses on a hormone free medium through long period could induce a progressive dilution of the original concentration of endogenous cytokinins, thus resulting in the generation of variant palms. Discrepancies between clonal lines could be explained by differences in the original concentration of cytokinins in embryo lines and by differences in cytokinins metabolism.

In Côte d'Ivoire, more than 1000 ha of clonal material from 230 clonal lines have been planted for genetic and agronomic performance tests carried out since 1985 (Durand-Gasselin *et al.*, 1993 ; Konan *et al.*, 1997 ; Duval *et al.*, 1997 ; Cochard *et al.*, 1999). Field assessment of floral conformity showed that the overall incidence of the « mantled » abnormality was within the 5-10 % range, with 40-50 % of clonal lines affected by somaclonal variation (Durand-Gasselin *et al.*, 1993 ; Konan *et al.*, 1995).

This rate of abnormality agreed with that observed in our study for palms originating from embryo cultures *in vitro* preserved for 7 years. Thus, if all embryo lines older than 6 years were discarded and if only palms originating from younger cultures were planted, the proportion of normal clonal lines would reach 60-90 %, with only 1-2 % of « mantled » palms. It is clear that a preservation strategy based on the *in vitro* preservation of somatic embryo lines could be acceptable only for short term purposes.

CRYOPRESERVATION OF SOMATIC EMBRYOS

Our study has enabled an assessment of the impact of the simplified procedure for cryopreservation of oil-palm somatic embryos

(Dumet *et al.*, 1993a,b) on the floral conformity of the regenerated material. The advantages of cryopreservation have been described by several authors (Berthaud, 1997 ; Engelmann and Takagi, 2000). In oil-palm, our results show that the utilization of the whole cryopreservation procedure did not have a detrimental impact on the floral conformity of regenerated palms. Our findings confirm results published on strawberry and cassava, showing that plants generated from cryopreserved meristems were not morphologically different from their non-cryopreserved counterparts (Kantha *et al.*, 1980 ; Bajaj, 1983). Similar results have been obtained after cryopreservation of *Musa* embryogenic suspension cultures (Cote *et al.*, 2000). In *Picea abies* and *Hevea brasiliensis*, an increase in the regeneration potential of embryogenic calluses after cryopreservation has even been described (Bercetche *et al.*, 1990 ; Engelmann *et al.*, 1997). These authors suggested that non-embryogenic tissues may have been preferentially destroyed during the cryopreservation procedure.

For oil palm, the cryopreservation protocol described by Dumet *et al.* (1993a, b) is based on two distinct steps : desiccation and freezing. Each of these two treatments did not induce any significant change in the floral conformity of offsprings. For one clonal line, the cryopreservation procedure was even found to decrease the rate of abnormal flowering. These results raise interesting questions about the selective pressure exerted on normal/abnormal cells by the cryopreservation protocol. It will be worth implementing a series of experiments in order to confirm that cells giving rise to abnormal embryos are more sensitive than normal ones to the cryopreservation procedure.

RECLONING FROM SOMAPLANTS

Our data have clearly shown that the presence of variants in one of the components of the triplet (ramet/population/clonal line) is sufficient for jeopardizing the recloning operation. This important result, when combined with the existence of a reversion towards normal phenotype with age (Durand-Gasselin *et al.*, 1993, Konan *et al.*, 1995 ; Duval *et al.*, 1997) paves the way for new research on the molecular determinism of the « mantled » somaclonal variation in oil palm.

Indeed, recent results have highlighted the role of DNA methylation in the occurrence of the « mantled » variation (Jaligot *et al.*, 2000 ; Jaligot *et al.*, 2004 ; Rival and Parveez, 2004). It will be worth investigating the DNA methylation status of plant material throughout the recloning protocol, and trying to correlate this status with the floral phenotype of regenerants. The epigenetic background of each recloned ramet, as reflected by the phenotypic status of the triplet (ramet/population/clonal line) should be explored with a DNA methylation perspective.

A preservation strategy based on the recloning of assessed somaclones can be acceptable in terms of genetic stability, provided that the selected ramet is deriving from a 100 % normal background (ramet/population/clonal line).

CONCLUSION

Three different approaches (namely : re-cloning of clonal material, *in vitro* preservation, and cryopreservation) for the preservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clonal genetic resources and their respective impact on the induction of the « mantled » somaclonal variation were assessed.

Results show that the cultivation of oil palm embryogenic lines on prolonged periods induced an increase in the proportion of « mantled » clonal lines and somaplants. It is clear that a preservation strategy based on the *in vitro* preservation of somatic embryo lines could be acceptable only for short term purposes (< 6 years). Nevertheless, discarding embryo cultures older than 6 years in commercial laboratories will have a significant impact on the average rate of « mantled » abnormality.

The utilization of the whole cryopreservation procedure did not have a detrimental impact on the floral conformity of regenerated palms. This strategy is thus considered as suitable for the long term preservation of clonal oil palm genetic resources.

A preservation strategy based on the recloning of assessed somaclones can be acceptable in terms of genetic stability, provided that the selected ramet is deriving from a 100 % normal background (ramet/population/clonal line).

REFERENCES

- Bajaj (Y. P. S.). 1983. Cassava plants from meristem cultures freeze-preserved for three years. *Fields Crops Research* 7 (3) : 161 - 167.
- Bercetche (J.), (M.) Galerne and (J.) Dereuddre. 1990. Greater capacity for regeneration of plantlets from embryogenic callus of *Picea abies* after freezing in liquid nitrogen. *C. R..Acad. Sci. Paris, Série 3*, 310 (8) : 357 - 362.
- Berthaud (J.). 1997. Strategies for conservation of genetic resources in relation with their utilization. *Euphytica* 96 : 1 - 12 - P 264.
- Besse (I.), (J. L.) Verdeil, (Y.) Duval, (B.) Sotta, (R.) Maldiney and (C.) Miginiac. 1992. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clonal fidelity : endogenous cytokinins and indoleacetic acid in embryogenic callus cultures. *J. Experim. Bot.* 43 : 983 - 989.
- Besse (I.), (T.) Beule, (J. L.) Verdeil and (Y.) Duval. 1994. Study of endogenous cytokinins levels associated with an anomaly in floral morphogenesis of *Elaeis*. In : Teisson C (eds) *In vitro* culture of tropical plants. CIRAD, Montpellier (France) : 37 - 41.
- Chabrillange (N.), (F.) Aberlenc-Bertossi, (M.) Noirot, (Y.) Duval and (F.) Engelmann. 2000. Cryopreservation of oil palm embryogenic suspensions. In : Engelmann F. and Tagaki H (eds). *Cryopreservation of tropical germplasm : Current research progress and applications*. Tsukuba (Japan) : IRCAS, Rome (Italy), IPGRI : 172 - 177.
- Cochard (B.), (T.) Durand-Gasselien, (P.) Amblard, (E.) Konan et (S.) Gogor. 1999. Production d'huile des clones de palmier à huile à l'âge adulte. In : *Proceedings of 1999 PIPOC Congress*, Kuala Lumpur (Malaysia). Kuala Lumpur, PIPOC : 12 - 22.
- Corley (R. H. V.), (C. H.) Lee, (I. H.) Law and (C. Y.) Wong. 1986. Abnormal flower development in oil palm clones. *Planter* 62 : 233 - 240.
- Corley (R. H. V.), (T.) Boonrak, (C. R.) Donough, (S.) Nelson and (F.) Dumortier. 1995. Yield of oil palm clones in different environments. In : *Proceedings of 1993 ISOPB International Symposium on Recent Development in Oil Palm Tissue Culture and Biotechnology*, (V. Rao, L.E. Henson and N. Rajanaidu, eds). *Int. Soc. Oil Palm Breeding*. Kuala Lumpur (Malaysia) : 145 - 157.

- Corley (R. H.). 2003. Oil palm : a major tropical crop. *Burotrop*, Bulletin 19, 2003 : 5 - 8.
- Cote (F. X.), (O.) Goue, (R.) Domergue, (B.) Panis and (C.) Jenny. 2000. In-Fields behaviour of banana plants (*Musa AA* sp.) obtained after regeneration of cryopreserved embryogenic cell suspensions. *Cryo-Letters* 21, 19 - 24.
- Dumet (D.), (F.) Engelmann, (N.) Chabrilange and (Y.) Duval. 1993a. Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a desiccation step. *Plant Cell Reports* 12 : 352 - 355.
- Dumet (D.), (F.) Engelmann, (N.) Chabrilange, (Y.) Duval and (J.) Dereuddre. 1993b. Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. *Cryo-Letters* 14 : 243 - 250.
- Durand-Gasselin (T.), (Y.) Duval, (L.) Baudouin, (A. B.) Maheeran, (K. E.) Konan and (J. M.) Noiret. 1993. Description and degree of the mantled flowering abnormality in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clones produced with ORSTOM-CIRAD procedure. In : Proceedings of 1993 ISOPB International Symposium on Recent Development in Oil Palm Tissue Culture and Biotechnology, (V. Rao, LE. Henson and N. Rajanaidu, eds). Int. Soc. Oil Palm Breeding. Kuala Lumpur (Malaysia) : 48 - 63.
- Durand-Gasselin (T.), (C.) Cochard, (P.) Amblard et (H.) De Franqueville. 2002. Un regard sur quarante ans d'amélioration génétique du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) et son impact sur la filière. *Le Sélectionneur Français* 53 : ISSN 0374 - 1621.
- Duval (Y.), (T.) Durand-Gasselin, (K. E.) Konan et (C.) Pannetier. 1988. Multiplication végétative du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) par culture *in vitro* : Stratégies et résultats. *Oléag.* 43 (2) : 29 - 44.
- Duval (Y.), (F.) Engelmann and (T.) Durand-Gasselin. 1995. Somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). In : Somatic embryogenesis and Synthetic Seed I., Biotechnology in Agriculture and Forestry, Y P S Bajaj (eds), Springer Verlag 30 : 335 - 352.
- Duval (Y.), (P.) Amblard, (A.) Rival, (K. E.) Konan, (S.) Gogor and (T.) Durand-Gasselin. 1997. Progress in oil palm tissue culture and clonal performance in Indonesia and the Côte d'Ivoire. International Planters Conference, Kuala Lumpur, 21-22 May 1997. Kuala Lumpur (Malaysia), PORIM : 291 - 307.
- Engelmann (F.), (Y.) Duval et (J.) Dereuddre. 1985. Survie et prolifération d'embryons somatiques de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) après congélation dans l'azote liquide. *C.R. Acad. Sci. Paris, Série* 3, Vol 301 (3) : 111 - 116.
- Engelmann (F.), (N.) Lartaud, (N.) Chabrilange, (M. P.) Carron and (H.) Étienne. 1997. Cryopreservation of embryogenic calluses of two commercial clones of *Hevea brasiliensis*. *Cryo-Letters* 18, 107 - 116.
- Engelmann (F.) and (H.) Takagi. 2000. Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm - Current Research Progress and Applications. JIRCAS, Tsukuba and IPGRI, Rome.
- Jaligot (E.), (A.) Rival, (T.) Beule, (S.) Dussert and (J. L.) Verdeil. 2000. Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) : the DNA methylation hypothesis. *Plant Cell Reports* 19 : 684 - 690.
- Jaligot (E.), (T.) Beulé, (F. C.) Baurens, (N.) Billote and (A.) Rival. 2004. MSAP screening for differentially methylated markers associated with the « mantled » somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Genome* 47 : 224 - 228.
- Jones (L. H.), (D. E.) Hanke and (C. J.) Euwens. 1995. An Evaluation of the Role of Cytokinins in the Development of Abnormal Inflorescences in Oil Palms (*Elaeis guineensis* Jacq.) Regenerated from Tissue Culture. *J. Plant Growth Regul* 14 : 135 - 142.
- Kartha (K. K.), (N. L.) Leung and (K.) Pahl. 1980. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105 (4) : 481 - 184.
- Konan (K. E.), (T.) Durand-Gasselin, (Y.) Duval et (B.) Kouamé. 1995. Anomalie de la morphogenèse florale (anomalie mantled) observée chez les plants de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) obtenus par embryogenèse somatique. Etude de la réversion vers un phénotype normal des plants non-conforme. In : 5^e Journées Scientifiques du Réseau AUPELF/UREF « Biotechnologie végétales » 13 au 15 Décembre 1995, Dakar (Sénégal). Paris, ESTEM : 26 - 46.
- Konan (K. E.), (T.) Durand-Gasselin, (B.) Cochard, (A.) Rival et (B.) Kouamé. 1997. Caractéristiques de production des vitroplants de palmier à huile plantés en Côte d'Ivoire en conditions agro-

- industrielles. In : 6^e Journées Scientifiques du Réseau AUPELF/UREF «Biotechnologie végétales », 30 Juin au 03 Juillet 1997, Orsay (France). Paris, ESTEM : 159 - 167.
- Konan (K. E.), (T.) Durand-Gasselin, (Y. T.) Kouadio and (A.) Rival. 2005. A modelling approach of the *in vitro* conversion of palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos. Plant Cell Tissue and Organ Culture 84 : 99 - 112
- Marmey (P. H.), (I.) Besse et (J. L.) Verdeil. 1991. Mise en évidence d'un marqueur protéique différenciant deux types de cals de même clone chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). C. R. Acad. Sci. Paris, t 313, Série III : 333 - 338.
- Meunier (J.), (L.) Baudouin, (B.) Nouy et (J. M.) Noiret. 1988. Estimation de la valeur des clones de palmier à huile. Oléag. 30 : 5 - 8.
- Noiret (J. M.). 1981. Application de la culture *in vitro* à l'amélioration et à la production de matériel clonal chez le palmier à huile. Oléag. 36 : 123 - 125.
- Pannetier (C.), (P.) Arthuis et (D.) Liévoux. 1981. Néof ormation de jeunes plants de *Elaeis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés *in vitro*. Oléag. 36 (3) : 119 - 122.
- Paranjothy (K.), (O.) Rohani, (A. H.) Tarmizi, (C. S.) Tan and (C. C.) Tan. 1989. Current status and strategies of oil palm tissue culture research. In : PORIM Int. Palm Oil Development Conferenec, Kuala Lumpur, PORIM : 109 - 121.
- Rao (V.) and (C. R.) Donough. 1990. Preliminary evidence of a genetic cause for the floral abnormalities in some oil palm ramets. *Elaeis* 2 : 199 - 207.
- Rival (A.), (F.) Aberlenc-Bertosi, (F.) Morcillo, (T.) Tregear, (J. L.) Verdeil, (T.) Durand-Gasselin, (K. E.) Konan et (B.) Kouamé. 1998. Multiplication clonale du palmier à huile par embryogenèse somatique du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.)- Programme de recherche lié au transfert d'échelle. Cahiers Agric. 7 : 492 - 498.
- Rival (A.), (J.) Tregear, (E.) Jaligot, (F.) Morcillo, (F.) Aberlenc-Bertosi, (N.) Billotte, (F.) Richaud, (T.) Beule, (A.) Borgel and (Y.) Duval. 2003. Biotechnology of the oil palm. In : Plant Genetic Engineering Vol ., Improvement of Commercial Plants II, P. K. Jawal and R. p. Singh (eds), SCI Tech Publising LLC, Houston, USA : 261 - 318.
- Rival (A.) and (M.) Parveez. 2004. *Elaeis guineensis*, Oil palm. In Biotechnology of Fruit and Nut Crops. R. LITZ (eds). Biotechnology in Agriculture Series n° 29, CABI Publishing, Wallingford, UK : 1113 - 143.
- Soh (A. C.). 1986. Expeted yield increase with selected oil palm clones from current seedling material. Oléag. 41 (2) : 51 - 56.
- Tregear (J.), (F.) Morcillo, (F.) Richaud, (A.) Berger, (S.) Rajinder, (S. C.) Chea, (C.) Hartmann, (A.) Rival and (Y.) Duval. 2002. Characterisation of a defensin gene expressed in oil palm influorescences : induction during tissue culture and possible association with epigenetic somaclonal variation events. J. Experim. Bot. 53 : 1387 - 1396.
- Wong (G.), (C. C.) Tan and (A. C.) Soh. 1996. Large scale propagation of oil palm clones : Experience to date. Acta Hort. 447 : 649 - 658.
- Wooi (K. C.). 1990. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) : Tissue Culture and Micropropagation. In : Y P S Bajaj (eds) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Legumes and Oilseed Crops I. Springer-Verlag 10 : 569 - 592.